

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-005287

(43)Date of publication of application : 09.01.1992

(51)Int.Cl.

C07D401/06
C07D401/12
C07D403/06
C07D403/12
C07D405/06
C07D405/12
C07D413/06
C07D413/12
C07D471/04
C07D491/056
G01N 31/22

(21)Application number : 02-105046

(71)Applicant : BIO SENSOR KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 20.04.1990

(72)Inventor : YAMADA SACHIKO
SHIMIZU MASATO

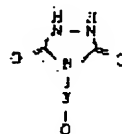
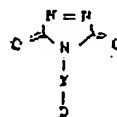
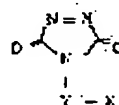
(54) REAGENT FOR DETERMINING VITAMIN DS AND PRODUCTION THEREOF

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound shown by formula I (X is fluorescent coloring group or potentially chemical luminous group; Y is spacer).

USE: For detecting and determining vitamin D, vitamin A and a metabolite thereof.

PREPARATION: A compound shown by formula II or formula III (Q is hydroxymethyl or amino) is coupled with a compound shown by the formula X-COC1.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平4-5287

⑮ Int. Cl.⁵

C 07 D 401/06
401/12
403/06

識別記号

庁内整理番号

8213-4C
8213-4C
8213-4C※

⑬ 公開 平成4年(1992)1月9日

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全26頁)

⑭ 発明の名称 ビタミンD類定量用試薬およびその製法

⑰ 特 願 平2-105046

⑱ 出 願 平2(1990)4月20日

⑲ 発 明 者 山 田 幸 子 東京都八王子市初沢町1227-4 高尾パークハイツA-1218

⑳ 発 明 者 清 水 正 人 東京都品川区大井1-34-4 早川ハイツ3号

㉑ 出 願 人 株式会社バイオセンサ 東京都豊島区高田3丁目41番8号
ー研究所

㉒ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三 外4名
最終頁に続く

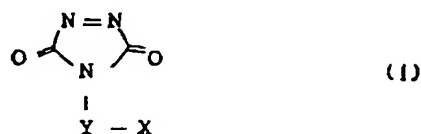
明 細 書

1. 発明の名称

ビタミンD類定量用試薬およびその製法

2. 特許請求の範囲

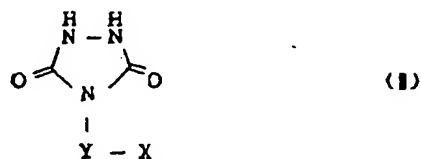
1. 一般式(I)



(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化
字発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

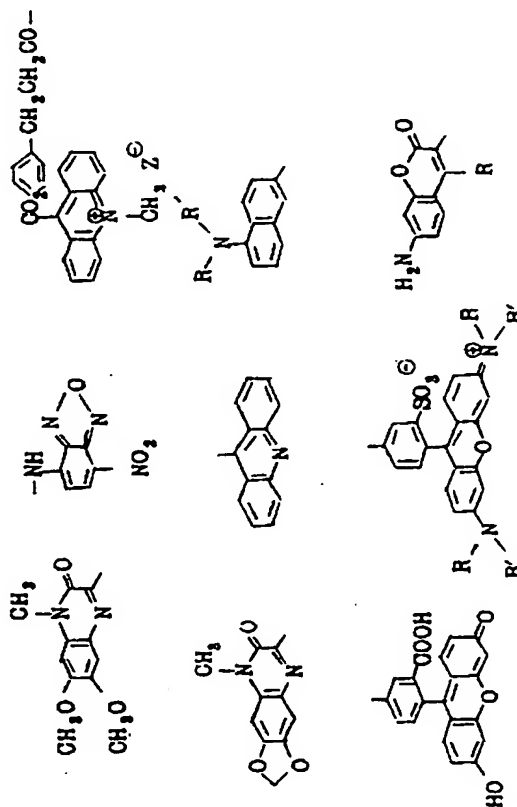
で表される化合物。

2. 一般式(II)

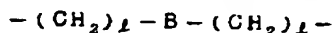


(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化
字発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

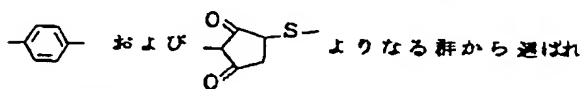
で表される化合物。



3. Xが下記式


$$-(CH_2)_4-$$


-B-は、-NH-、-COO-、-SO₂NH-、



i は 1 から 5 までの整数を示し、

■は0から5までの整数を示し、

n は 0 または 1 のいずれかを示す)

で示される蓋よりなる群から選ばれた一員である
(但し、Yのそれぞれの式の左端は鎖の末端原子
と右端はXと結合する)。

請求項 1 または 2 に記載の化合物。

4. X が下配式



で示される基よりなる群から選ばれた一員であり、

$$-\text{CO}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4- \quad , \quad -\text{CONH}-\text{C}_6\text{H}_4-$$
$$-(CH_2)_n-$$

で示される基よりなる群から選ばれた一員である

(但し、 Y のそれぞれの式の左端は炭の酸素原子と、右端は X と結合する)。

請求項3に記載の化合物。

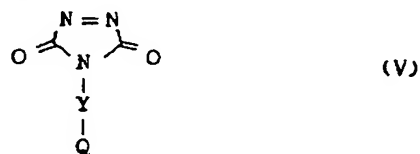
5. X が下記式 (■)


$$-\text{CO}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-$$

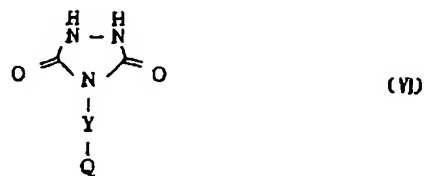
(142)

で示される基である。請求項 3 に記載の化合物。

6. 一般式 (V)



または (V)



(式中、Yはスベーターを示し、

Qはヒドロキシメチル基またはアミノ基を示す)(3)

で表される化合物を一般式(VII)



(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基を示す)

で表される化合物とカップリングすることを特徴とする一般式(I)



(式中、XおよびYは前記の意味を有する)

または一般式(II)

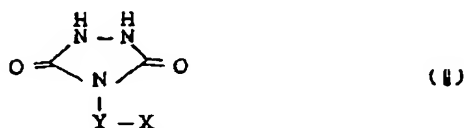


(式中、XおよびYは前記の意味を有する)

で表される化合物の製造方法。

7. 一般式(VIII)

または一般式(III)



(式中、XおよびYは前記の意味を有する)

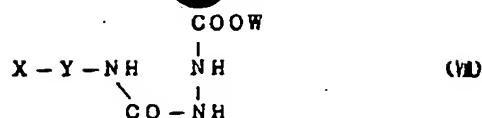
で表される化合物を蛍光もしくは化学発光試薬として用いることを特徴とする。化学構造中にcis-ジエン構造を持つ化合物の検出および定量分析法。

9. 一般式(IV)



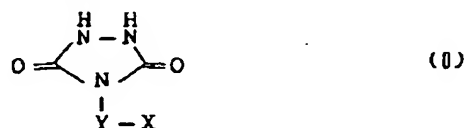
(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

または一般式(V)



(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基を示し、Yはスペーサーを示し、WはC₁-C₃アルキル基を示す)

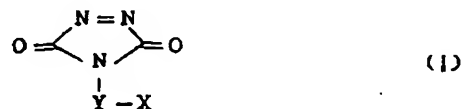
で表されるセミカルバジド体を閉環することを特徴とする一般式(VI)



(式中、XおよびYは前記の意味を有する)

で表される化合物の製造方法。

8. 一般式(I)



(式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基を示し、Yはスペーサーを示す)

(式中、XおよびYは前記の意味を有する)

で表される化合物を蛍光もしくは化学発光試薬として用いることを特徴とする。ビタミンD、ビタミンAまたはこれらの代謝物の検出および定量分析法。

3. [発明の詳細な説明]

産業上の利用分野

本発明は蛍光性発色団あるいは化学発光能を有する官能基を持つcis-ジエン試薬とその製法に関する。更にはその試薬を用いてのcis-ジエンを持つ化合物、特にビタミンD、ビタミンAおよびこれらの代謝物の検出、定量分析法に関する。

従来の技術・発明が解決しようとする課題

活性ビタミンD₃、代謝物の1 α 、25-ジヒドロキシビタミンD₃がカルシウム代謝のみならず骨の細胞の様々なものの増殖や分化を調節する多くの機能を持ったステロイドホルモンであることは現在よく知られている。ビタミンDの生物学的役割を十分理解するために様々な臨床の場におけるヒト血漿中の主要代謝物の濃度を正確に知るこ

とは重要なことである。

(4)

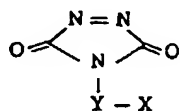
一般に使用されている既合的結合分析は特異性を欠くので、重要な代謝物は、分析に先立って分けられていなければならない。また、この分析法は正確さに欠ける。ガスクロマトグラフィー-質量分析法は測定の手続きが煩雑であるなどの問題がある。

従ってビタミンD代謝物を分析するための正確で特異的かつ高感度の方法が必要とされていた。

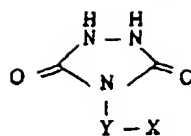
課題を解決するための手段

本発明者らは、ビタミンD、ビタミンAまたはそれらの代謝物の共役したトリエンの部分と速く特異的かつ定量的に反応する新規な、蛍光もしくは化学発光試薬(Ⅰ)および(Ⅱ)を合成した。

本発明の化合物は下記一般式(Ⅰ)および(Ⅱ)で示される。



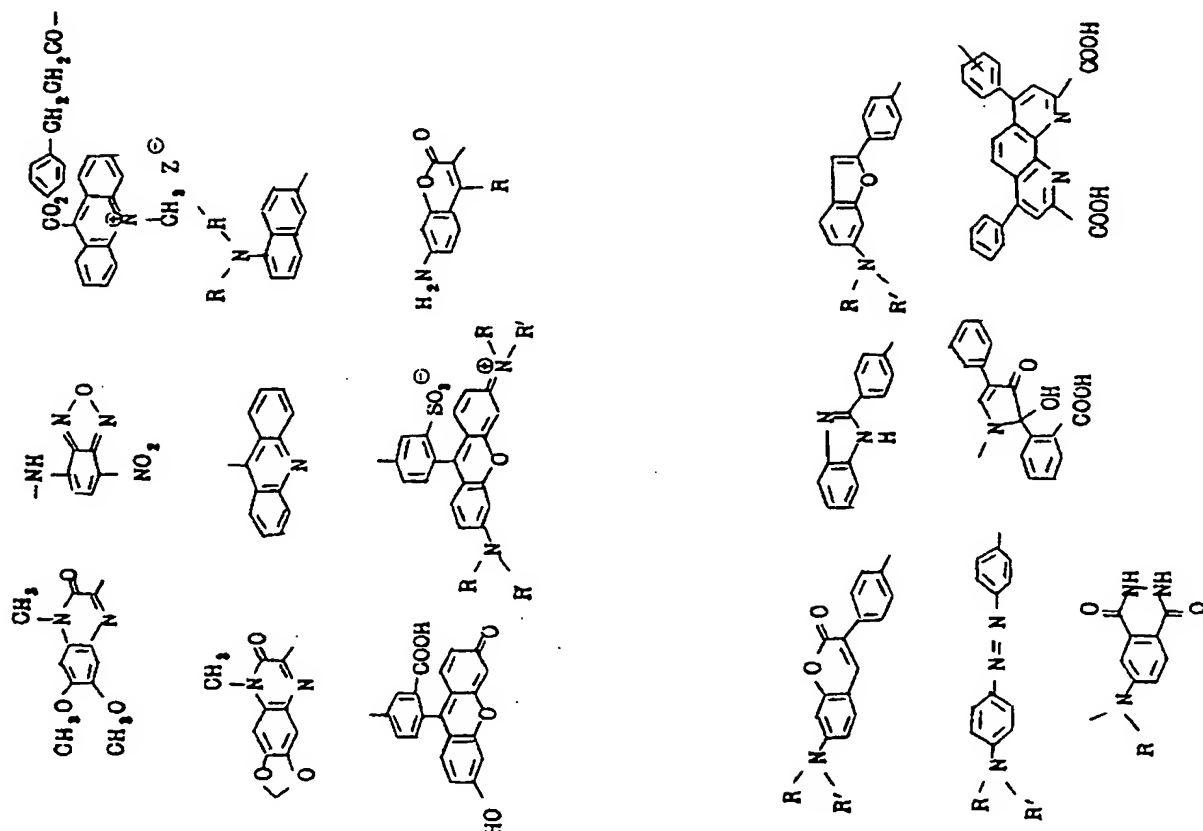
(Ⅰ)



(Ⅱ)

各式中、Xは蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基であり、Yはスペーサーである。

Xの例としては下記式



(5)

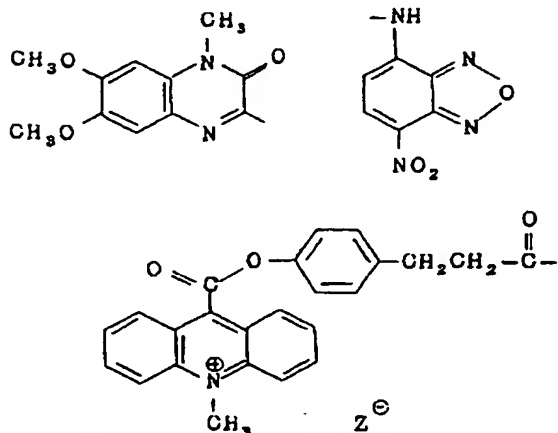
(式中Zは酸の共役塩基を示し；

RおよびR'は同一でも異なってもよく、

水素原子またはアルキル基を示す)

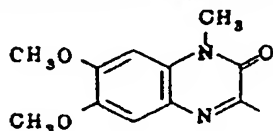
で示されるものが挙げられる。

Xの好ましい例としては下記式

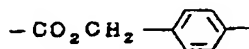


(式中Zは前記と同じ意味を示す)

で示されるものが挙げられる。式

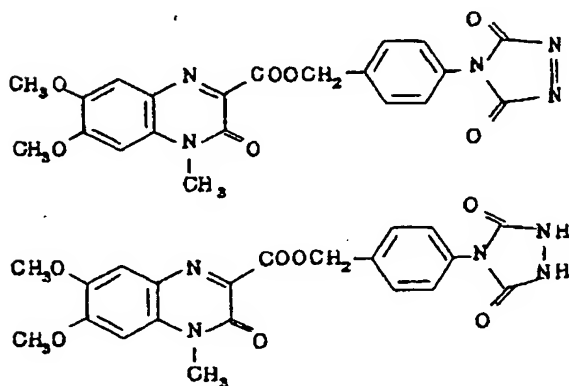


(但しnは前記と同じ意味を示す)で示されるものが挙げられる。式



である場合が特に好ましい。

本発明の化合物の好ましい例としては、式



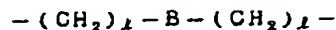
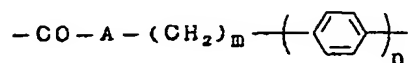
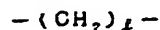
で表されるものが挙げられる。

本発明の一般式(I)および(II)で示される化合物は、

以下の様にして合成される。

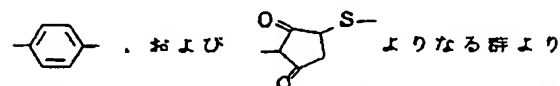
である場合が特に好ましい。

一方、Yの例としては下記式



(式中、-A-は-O-または-NH-を示し、

-B-は-NH-、-COO-、-SO2NH-、



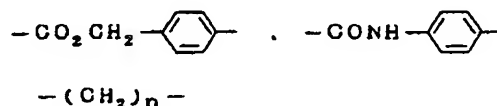
選ばれた一員を示し、Lは1から5までの整数

を示し、Mは0から5までの整数を示し、nは

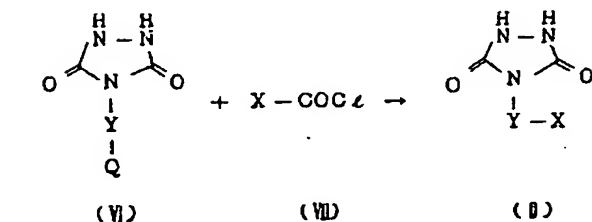
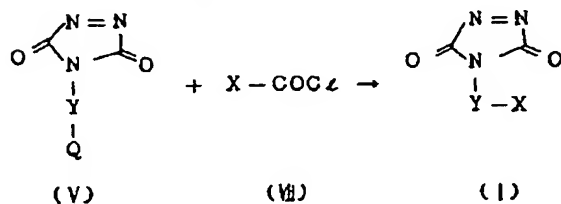
0または1のいずれかを示す)

で示されるものが挙げられる。但しYのそれぞれの式の左端は一般式(I)または(II)の環の窒素原子と、右端はXと結合する。

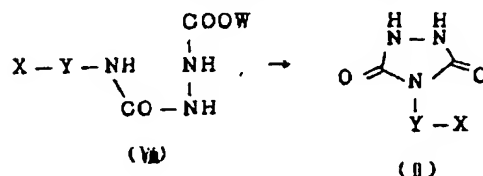
Yの好ましい例としては下記式



A) トリアゾリジンシントンと発色団シントンとのカップリングによる方法。



B) セミカルバジド体を最後に閉環する方法。



(式中、XおよびYは前記と同じ意味を示し、

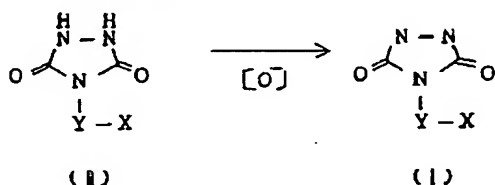
Qはヒドロキシメチル基またはアミノ基を示し、

WはC₁-C₃ アルキル基を示す)

A)法として一般式(V)と(VII)から(I)を得る反応または一般式(VI)と(VII)から(II)を得る反応は、塩クロリド体(VII)を無水ベンゼン等の溶媒に溶解し、(V)または(VI)の無水DMF溶液を加え、蒸流することによって行う。

B)法として一般式(VII)から(II)を得る反応は、無水炭酸カリウム等の共存下(VII)を無水エタノール等の溶媒に懸濁し、蒸流することによって行う。

また、試薬(II)が不安定な場合、下記反応式のように(II)より用時調製する。



一般式(II)から(II)を得る反応は、Pb(OAc)₄、PhI(OAc)₂等の緩やかな酸化剤で酸化することにより行う。

融点は、微量融点測定器(柳本製作所製)にて測定し、未補正。IRスペクトルは、日本分光FT/IR-7000型にて測定。MSスペクトルは、日本電子JMS-D300型にて電子衝撃法(EI)あるいは、日立M-2000型にてSIMS法にて測定。¹H-NMRスペクトルは、日本電子GX-270型にて測定し、tetramethylsilaneを内部標準として、化学シフトをδ値で示した。測定溶媒は、各化合物ごとに記した。なおD₂O中での測定には、3-(trimethylsilyl)-propionic acid-d₄ sodium saltを内部標準に用いた。NMRの記数は、次の略号によった。s=singlet; d=doublet; t=triplet; q=quartet; m=multiplet; arom=aromatic; br=broad; sig=signal。TLC(薄層クロマトグラフィー)は、Kiesel gel GF₂₅₄(Merck社製)を使用。カラムクロマトグラフィーは、特記しない限り、シリカゲルは、Merck社製Kiesel gel 60(35-70 mesh)を使用。反応は、ルーティンにアルゴン気流下で行なった。

作用

本発明の一般式(I)および(II)で示される化合物は、ビタミンD、ビタミンAおよびそれらの代謝物のcis-ジエンの部分を選択的に検知する蛍光の強い求ジエン試薬である。

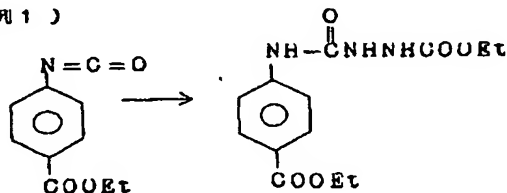
求ジエングループとして選ばれた4-置換-1,2,4-トリアゾリジン-3,5-ジオンは反応性が高く、緩やかな条件下で少量の基質と定量的に反応する。また対称であるので1種の幾何異性体しかできないという利点を持つ。

蛍光発色団またはポテンシャル化学発光基として選ばれたXで示される基は、高い発光効率を持っており、またこれらはトリアゾリジン環の酸化条件下でも安定である。

以下に本発明を製造例及び実施例によって更に詳しく説明するが、本発明はこれらの製造例及び実施例によって何ら限定されない。

製造例及び実施例

(製造例1)



エチル4-イソシアナトベンゾエイト(5.0g、0.026mol)の無水ベンゼン溶液(260ml)中に、室温撹拌下カルバジン酸エチル(3.4g、0.033mol)を加えた後、反応混合物を2時間加熱蒸流した。室温に戻した後、析出結晶を吸引し、粗セミカルバジト1(7.25g、収率93.9%)を得た。本品をEtOHより再結晶し、無色鱗片状晶(6.80g)を得た。

化合物1:

mp 194-195°C

MS m/z (M⁺): 295(6), 250(7), 204(5),

146(65), 104(100).

KBr IR ν_{max} cm⁻¹: 3308(NH), 1707及び

1673(C=O)

¹H-NMR(CDCl₃+DMSO-d₆) δ:

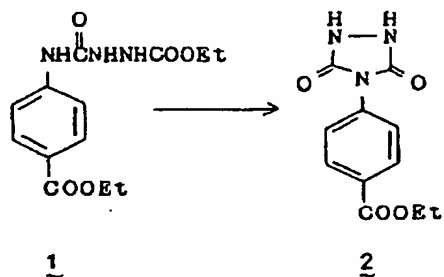
128 (3H, t, J=7.3 Hz, CH₂CH₃) (7)
 138 (3H, t, J=7.3 Hz, CH₂CH₃)
 4.19 (2H, q, J=7.3 Hz, CH₂CH₃)
 4.33 (2H, q, J=7.3 Hz, CH₂CH₃)
 7.52 及び 7.92
 (4H, AA'BB', J=8.6 Hz, aromH)
 7.70 (1H, br. sig. NH)
 7.80 (1H, br. sig. NH)
 8.57 (1H, br. sig. NH)

元素分析: 計算値

(C₁₃H₁₇N₃O₅): C. 52.87; H. 5.80; N. 14.23

測定値: C. 52.71; H. 5.72; N. 14.14

(製造例2)



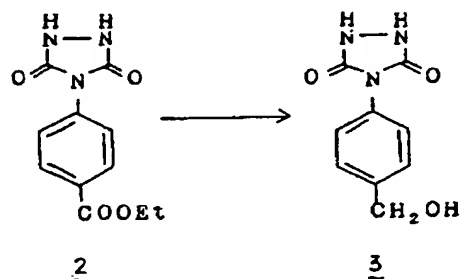
1.40 (3H, t, J=7.3 Hz, CH₂CH₃)
 4.37 (2H, q, J=7.3 Hz, CH₂CH₃)
 7.71 及び 8.10 (4H, AA'BB',
 J=8.9 Hz, aromH)
 10.29 (2H, br. s, 2×NH)

元素分析: 計算値

(C₁₁H₁₁N₃O₄): C. 53.03; H. 4.45; N. 16.86

測定値: C. 53.00; H. 4.51; N. 16.95

(製造例3)



<方法1>

エステル体2 (355 mg, 1.43 mmol) の無水 THF (8.5 ml) 溶液をドライアイス及び四塩化炭素層を用いて -20℃ に冷却し、本冷却・攪

セミカルバジド1 (1.181 g, 4 mmol) を無水 EtOH (50 ml) に溶解し、粉砕した無水炭酸カリウム (553 mg, 4 mmol) を加えた後、反応液を5時間加熱還流した。減圧下 EtOH を留去し、残渣に水冷水を加え、さらに希塩酸を用いて水層を酸性とした。水層は、AcOEt (3×60 ml) にて抽出し、AcOEt 層は、飽和食塩水にて洗浄、無水炭酸マグネシウムにて乾燥し、蒸留留去した。結晶性残渣 (901 mg) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (45 g) にて精製し、10% MeOH 含有 AcOEt 溶出部よりトリアゾリジン2 (808 mg, 収率 81.1%) を結晶状に得、AcOEt より再結晶し無色針状品を得た。

化合物2

mp 206-207℃

MS m/z (%): 249 (M⁺, 35), 221 (31),

204 (100), 191 (13),

163 (21), 146 (72),

KBr IR ν_{max} cm⁻¹: 1723 及び 1688 (C=O)

¹H-NMR (CDCl₃ + DMSO-d₆) δ:

拌溶液に水素化ジイソブチルアルミニウム (642 ml; 1 mol/L トルエン溶液) を約20分間にわたって滴加した。反応混合液は、更に -20℃ にて4時間攪拌した後、希塩酸 (2 ml, 19.3 mmol) の塩化水素を含む) を加えて酸性にした。減圧下溶媒を留去し得られた残渣を2 g のシリカゲルに吸着し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (40 g) に付し精製した。カラムは、10% MeOH 含有 CHCl₃ にて溶出し、2を含む分画を固体状 (337 mg) に得、MeOH により結晶化させ、純粋なベンジルアルコール体3 (240 mg, 収率 81.4%) を無色針状品として得た。

<方法II> —スケールの大きい反応に通ずる—

エステル体2 (1576 g, 6.32 mmol) を用いて、方法Iと同様に反応・後処理を行なった。塩酸処理後の生成物を水 (60 ml) に懸濁させ、不溶物を綿毯ろ過した。ろ液は、水にて充填した Amberlite XAD-2 カラム (700 ml) に通しベンジルアルコール体3を樹脂に吸着させた後、水 (1500 ml) にてカラムを洗浄した。MeOH

を用いて吸着している3を蒸出すると、固体状残渣(1.170g)が得られ、本品をMeOHより再結晶し、ベンジルアルコール体3(794mg、収率60.6%)を得た。

化合物3:

mp >300°C

MS m/z(%): 207(M⁺, 82), 178(100), 148(22), 132(14), 120(29), 107(47), 58(55).

IR ν_{max} cm⁻¹: 3344(OH), 1682(C=O)

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ :

4.54 (2H, s, CH₂Ph)

7.40 (4H, s, aromH)

10.38 (2H, s, 2×NH)

元素分析: 計算値

(C₉H₉N₃O₃): C, 52.17; H, 4.38; N, 20.28

測定値: C, 51.99; H, 4.44; N, 20.25

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ :

12.1 (3H, t, J=6.9Hz, CH₂CH₃)

4.08 (2H, q, J=6.9Hz, CH₂CH₃)

7.73 (2H, br, sig, aromH)

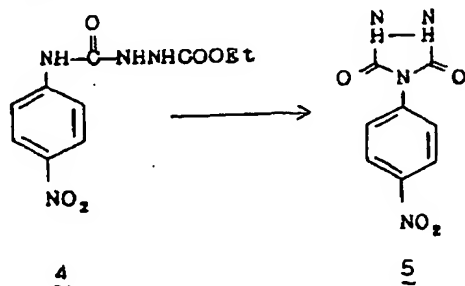
8.15 (2H, aromH)

8.36, 9.02及び9.48

(各々 1H, br, s, 3×NH)

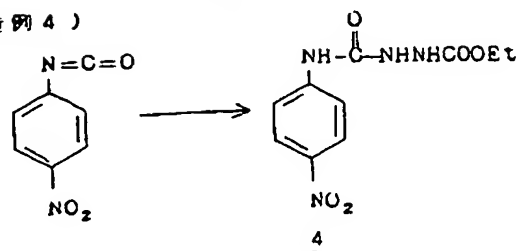
(文献) F. Arndt, L. Loewe, and A. Tarlan-Akón, Rev. Fac. Sci. Forest Univ. Istanbul, 13A, 127(1948); Chem. Abstr., 42, 8190(1948)

(製造例5)



セミカルバジド4(4.08g, 15.2 mmol),

(8) (製造例4)



イソシアン酸p-ニトロフェニル(5.0g, 30.5 mmol), カルバジン酸エチル(3.97g, 30.5 mmol)及び無水ベンゼン(130ml)の混合液を1.5時間、加熱還流した。析出した淡黄色粗結晶を吸引ろ取し、ベンゼンにてよく洗浄し、セミカルバジド4(7.85g, 収率97.6%)を得た。本品をMeOHより再結晶し、無色鱗片状品を得た。

化合物4:

mp 216~217°C (Lit. mp 218.0~218.5°C)

MS m/z(%): 268(M⁺, 0.3), 222(3), 164(100).

IR ν_{max} cm⁻¹: 1686(C=O)

1553及び1338(NO₂)

粉砕した無水炭酸カリウム(250g, 15.2 mmol)及び無水EtOH(200ml)の懸濁液を3時間加熱還流した。反応混合液は、黄色から暗赤色へと変化した。減圧下EtOHを留去した後、残渣に氷冷水(300ml)を加え、2N HClにて酸性とした。本水層は、AcOEt(3×150ml)にて抽出、芒硝にて乾燥し、AcOEtを留去すると、粗結晶性生成物(3.70g)を得、このものをアセトンより再結晶すると、無色針状晶の5(2.73g, 収率80.7%)が得られた。

化合物5:

mp 267~269°C (Lit. mp 270.0~271.5°C)

MS m/z(%): 222(M⁺, 100), 192(5), 165(27).

IR ν_{max} cm⁻¹: 1705(C=O)

1528及び1348(NO₂)

¹H-NMR(DMSO-d₆) δ :

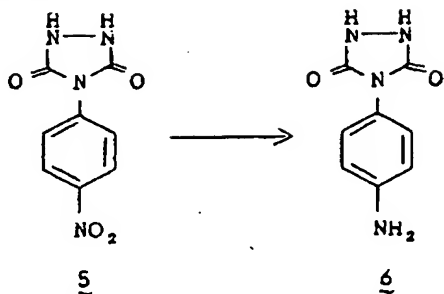
7.90及び8.34(4H, AA' BB', J=9.2Hz, aromH)

10.78(2H, br, s, 2×NH)

(文献) G. Zinner and W. Deucker, Arch. Pharm.,

294,370(1961)

(製造例6)



ニトロ体5 (787mg, 3.54mmol) のEtOH
溶液 (60ml) を、PtO₂ (80mg) 存在下、常
圧・常温にて水素気流中接触還元を行なった。水
素開始約40~50分後、反応容器内に結晶が析
出し始めた。2時間後に理論水素消費量 (240
ml) に達したので反応を終了した。析出結晶は、
AcOEt 及び EtOH を用いて溶解させた後、セラ
イトを通して吸引ろ過した。母液を減圧下蒸餾留
去すると粗アミノ体6 (720mg, 収率定量的)
を結晶状に得た。本品は、EtOH-AcOEt (1:1
; v/v) にて再結晶すると無色針状晶を与えた。

のセミカルバジド7 (659g) を得た。結晶母
液 (2.24g) をシリカゲルカラムクロマトグラ
フィー (Wacogel C-200, 100g) にて精製し、
2~5% MeOH 含有 CHCl₃ 系抽出部よりさらに7
(517mg) が得られた。合計収率は、76.0%
であった。

化合物7:

mp 107.0~108.5℃

MS m/z(%): 225 (M⁺+2, 0.08), 223 (M⁺,
0.2), 178 (2), 180 (0.7),
141 (16), 104 (100).

KBr
IR ν_{max}cm⁻¹: 3328 (NH)

1721 及び 1649 (C=O)

¹H-NMR (CDCl₃) δ:1.29 (3H, t, J=6.9Hz, CH₂CH₃)2.00 (2H, m, CH₂CH₂CH₂)3.39 (2H, m, -CH₂NH-)3.59 (2H, t, J=5.8Hz, C₄CH₂-)4.21 (2H, q, J=6.9Hz, CH₂CH₃)

5.68 (1H, m, NH)

(9) 化合物6:

mp > 300℃

MS m/z(%): 192 (M⁺, 99), 134 (100),
105 (54), 79 (24)

KBr
IR ν_{max}cm⁻¹: 1690 (C=O)

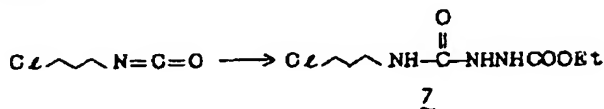
¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:5.21 (2H, br. s, NH₂)

6.60 及び 6.97 (4H, AA' BB',

J=8.6Hz, arom H)

10.14 (2H, br. s, 2×NH)

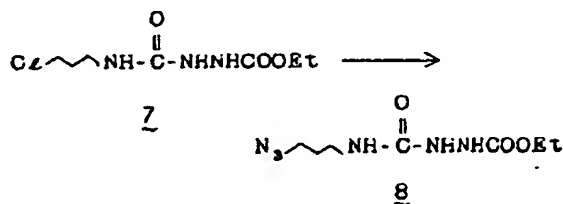
(製造例7)



3-クロロプロピルイソシアネイト (5.0g,
41.8mmol) の無水ベンゼン溶液 (120ml)
にカルバジン酸エチル (5.2g, 50.2mmol)
を加え、加熱還流1時間行なった。減圧下蒸餾を
留去すると粗生成物 (9.25g) が結晶状に得ら
れ、本品を AcOEt-Et₂O より再結晶し、純品

6.73 及び 6.81 (各々 1H, br. s,
2×NH)

(製造例8)



セミカルバジド7 (5.256g, 23.5mmol)
の無水DMF溶液 (55ml) にNaN₃ (1830g,
28.2mmol) を加え、100℃にて3.5時間、
加熱攪拌した。減圧下DMFを留去し、残渣に水
(50ml) を加えて、AcOEt (5×70ml) にて
抽出した。合一したAcOEt 層は、水洗、芒硝乾
燥し、蒸餾留去すれば、粗アジド体8 (5.13g,
収率94.8%) が結晶状に得られた。本品をエー
テルより再結晶し、無色結晶 (3.60g) を得た。

化合物8:

mp 81~82℃

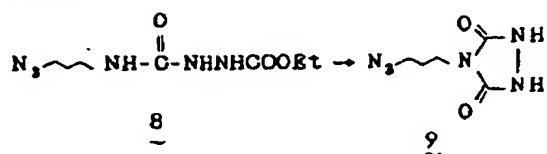
MS m/z(%): no M⁺, 185 (2), 141 (3).

116(2), 104(100)
 KBr
 IR $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$: 3260(NH)
 2102(N_3)
 1734 及び 1671(C=O)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ :

1.29 (3H, t, $J=7.3\text{Hz}$, CH_2CH_3)
 1.80 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)
 3.33 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{NH}-$)
 3.37 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$, N_3CH_2-)
 4.21 (2H, q, $J=7.3\text{Hz}$, CH_2CH_3)
 5.64 (1H, m, NH)
 6.66 及び 6.73 (各々 1H, br. s, $2 \times \text{NH}$)

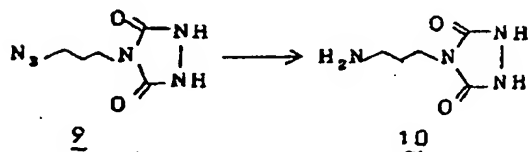
(製造例9)



アジド体8 (3.60g, 15.6 mmol), 粉碎した無水炭酸カリウム (2.60g, 18.7 mmol)

3.38 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)
 3.43 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$)
 10.06 (2H, br. s, $2 \times \text{NH}$)

(製造例10)



アジド体9 (1.70g, 9.23 mmol) を EtOH (19 ml) 及び H_2O (7.5 ml) に溶解し、10% Pd-C (177 mg) 存在下常圧水素接触還元付した。室温下96時間反応を行なった後、反応液は、セライトを通して触媒を除去した。母液は、減圧下溶液留去すると結晶性残渣 (1.629g) が得られ、 $\text{H}_2\text{O}-\text{MeOH}$ より再結晶すると遊離アミノ体10 (1.007g, 収率69.0%) が無色針状晶として得られた。

化合物10

mp 227~229°C
 MS m/z (%): 158 (M^+ , 100), 141 (50).

(10) 及び無水 EtOH (140 ml) の懸濁液を加熱還流3時間行なった。減圧下 EtOH を留去し、残渣に水 (50 ml) を加え、2N HCl にて弱酸性とした。この酸性の水層は、あらかじめ水にて調整しておいた Amberlite XAD-2 カラム (450 ml) を通した。カラムは水 (750 ml) にて水洗した後、MeOH にて、生成物を樹脂より脱脂・溶出させた。合一した MeOH 溶出部を蒸留留去し、粗結晶生成物を得、このものを AcOEt より再結晶し、純品の9 (2.58g, 収率89.8%) を無色鱗片状晶として得た。

化合物9

mp 140~141°C
 MS m/z (%): nom^+ , 141 (20), 129 (39), 101 (100)
 KBr
 IR $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$: 2100(N_3)
 1667(C=O)
 $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ :
 1.78 (2H, qui met, $J=6.6\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)
 (36)

129 (47), 101 (95), 56 (94).
 KBr
 IR $\nu_{\max} \text{cm}^{-1}$: 1682(C=O), 1618(NH).

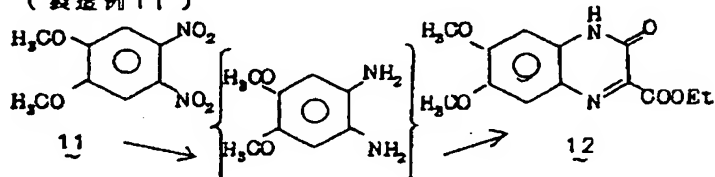
$^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ :

2.00 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)
 3.03 (2H, t, $J=7.4\text{Hz}$, CH_2NH_2)
 3.60 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$, $-\text{CH}_2-\text{N}$)

化合物10の塩酸塩

アジド体9 (1.40g, 0.76 mmol) を EtOH (20 ml) 及び炭酸酸 (0.4 ml) に溶解し、10% Pd-C (30 mg) 存在下、3.0 kg/cm^2 水素圧にて中圧接触還元を行なった。室温にて4時間後、反応を終了し、上記と同様に処理すると、10のHCl塩が結晶状に得られ、MeOH-Et₂Oより再結晶し、純品の10 HCl塩 (93.0 mg, 収率63.0%) が無色針状晶として得られた。

(製造例11)



ジニトロベラトロール 11 (2.28 g, 10 mmol) (11) MS m/z (%) : 278 (M^+ , 100), 233 (7), 204 (83), 189 (31)
 を加温下 EtOH (100 ml) に溶解させた。P₂O₅ (0.23 g) 存在下、室温、常圧水素気流中炭酸還元を行なった。攪拌 2.5 時間後、水素の消費が完全に停止 (理論水素消費量 1.3 L) したので反応を終了した。還元生成物は、すばやく窒素気流下、セライトを通し酸媒を除き、母液は、ジエチルエトマロネート (1.74 g, 10 mmol) をあらかじめ入れておいた反応容器内へ直接導入した。反応混合溶液は、直ちに加熱還流 1 時間行なった後、室温にて一晩放置した。析出した結晶を吸引ろ取し、粗結晶生成物 12 (2.11 g, 収率 75.8%) を得、EtOH-CH₂Cl₂ より再結晶を行ない、黄緑色針状晶 (1.98 g) を得た。一方、結晶母液 (0.80 g) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (4.5 g) にて精製し、1% MeOH 含有 CHCl₃ 溶出部より、さらに 12 (0.33 g) を得、合計収率は、83.0% であった。

化合物 12

mp 250~251°C (Lit. 255°C)

NaH (0.26 g, 10.97 mmol) を無水 DMF (5 ml) に懸濁し、本冷却 (0°C)、攪拌懸濁液に、12 (2.03 g, 7.31 mmol) の無水 DMF (60 ml) 溶液を約 20 分間かけて滴加した。水素ガスの発生が終わり、母液の色が黄色から黄褐色に変化したのを確認後 (約 20~30 分)、ヨウ化メチル (0.68 ml, 10.97 mmol) を約 5 分間かけて滴加した。反応混合溶液は、更に氷冷下 1.5 時間攪拌後、氷冷水 (150 ml) 中に注ぎ、CHCl₃ (3×150 ml) にて抽出した。CHCl₃ 抽出層は、飽和食塩にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去して、黄色残渣 (2.74 g) を得た。本生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (130 g) にてより精製し、CHCl₃ : Benzene (1:1; v/v) 溶出部より、O-メチル体 14 (0.10 g, 収率 4.7%) を淡黄色結晶として、また CHCl₃ 溶出部から N-メチル体 13 (1.72 g, 収率 80.4%) を黄色結晶として得た。N-メチル体 13 は、EtOH-Et₂O より再結晶し、黄色針状晶を得、14 は、Et₂O-n-Hexane より

KBr

IR ν_{\max} cm⁻¹ : 1730 及び 1650 (C=O)¹H-NMR (CDCl₃+CD₃OD) δ :1.48 (3H, t, J=7.0 Hz, CH₂CH₃)3.99 及び 4.06 (each 3H, s, 2×OCH₃)4.56 (2H, q, J=7.0 Hz, CH₂CH₃)

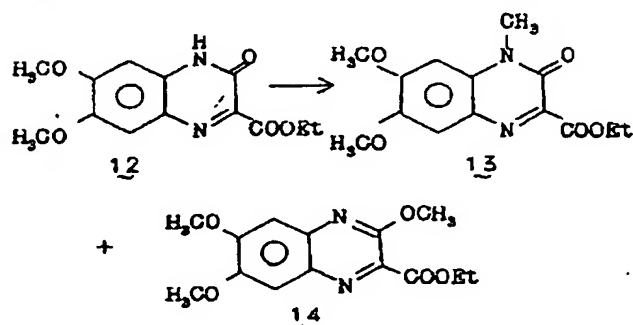
6.94 及び 7.38 (各々 1H, s, arom H)

(文献) Z. Buděšínský and A. Valenta,

Collection Czechoslov. Chem. Commun.,

36, 2527 (1971)

(製造例 12)



再結晶し、淡黄色針状晶を得た。

化合物 13

mp 166~167°C

MS m/z (%) : 292 (M^+ , 100), 278 (11),

277 (12), 247 (16), 220

(45), 205 (6), 192 (22),

177 (15), 147 (12)

KBr

IR ν_{\max} cm⁻¹ : 1730 及び 1640 (C=O)¹H-NMR (CDCl₃) δ :1.44 (3H, t, J=7.0 Hz, CH₂CH₃)3.73 (3H, s, N-CH₃)

3.94 及び 4.05 (each 3H, s,

2×OCH₃)4.51 (2H, q, J=7.0 Hz, CH₂CH₃)

6.71 及び 7.36 (each 1H, s, arom H)

化合物 14

mp 123~125°C

MS m/z (%): 292 (M^+ , 100), 247 (16),
220 (45), 205 (18), 190
(69), 177 (15), 161 (12).

KBr
IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 1720 (C=O)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ :

1.46 (3H, t, $J=8.0\text{Hz}$, CH_2CH_3)

4.00, 4.06 及び 4.16 (each 3H,

S, $3 \times \text{OCH}_3$)

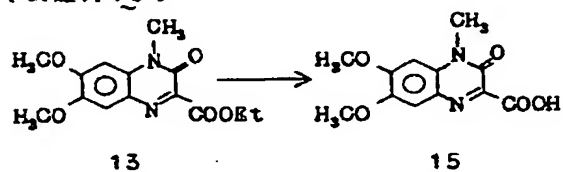
4.52 (2H, q, $J=8.0\text{Hz}$, CH_2CH_3)

7.10 及び 7.41 (each 1H, S, arom H)

元素分析: 計算値

測定値:

(製造例 13)



N-メチル体 13 (0.48g, 1.63 mmol) の
1,4-ジオキサン (5 ml) 溶液に 1 N NaOH 水溶液

カルボン酸 15 (470mg, 1.78 mmol) 及び
 SOCl_2 (10 ml) の混合溶液を 1 時間加熱還流し
た。減圧下、過剰の SOCl_2 を留去し、得られた
赤褐色結晶を無水ベンゼン-*n*-ヘキサンより再
結晶し、黄赤色針状品の酸クロリド 16 (435mg,
収率 86.3%) を得た。

化合物 16

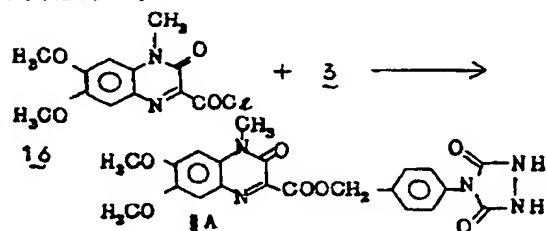
mp 272-273°C (分解) (Lit. mp 261°C)

MS m/z (%): 284 ($M^+ + 2$, 21), 282 (M^+ , 62),
247 (100), 219 (51), 191 (42)

KBr
IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 1754 及び 1649 (C=O)

(文献) T. Iwata, M. Yamaguchi, S. Hara and
M. Nakamura, J. Chromatogr., 362,
209 (1986)

(実施例 1)



(12) 液 (5 ml) を加え、室温下 10 分間攪拌した。反
応液は 1 N HCl を用いて弱酸性とした後、 CHCl_3
にて、水層の蛍光が消失するまで繰り返し抽出し
た。合一した CHCl_3 層は、水洗、芒硝乾燥後、溶
媒を留去し、黄色粗結晶カルボン酸 15 (0.39g,
収率 90.7%) を得た。本品は、 CHCl_3 より再
結晶を行ない、黄色針状品を得た。

化合物 15

mp 241-243°C (Lit. mp 222°C)

MS m/z (%): 264 (M^+ , 27), 220 (100),
205 (27), 177 (16)

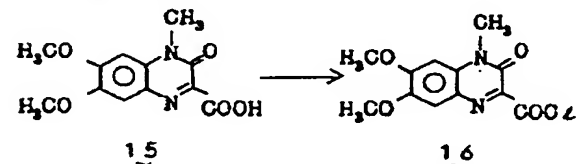
KBr
IR $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 1742 (C=O)

(文献) T. Iwata, M. Yamaguchi, S. Hara,

M. Nakamura, and Y. Ohkura,

J. Chromatogr., 362, 209 (1986)

(製造例 14)



酸クロリド 16 (113mg, 0.4 mmol) を無水
ベンゼン (8 ml) に溶解し、本攪拌還流溶液に、
ベンジルアルコール体 3 (124mg, 0.6 mmol)
の無水 DMF (0.5 ml) 溶液を一気に加え、0.5
時間還流を継続した。3 の添加と同時に黄色沈殿
物が生成し始めた。反応液を 0°C に冷却し、析出
結晶を吸引ろ取し、ベンゼンにて洗浄した。黄色
粗結晶 (184mg) は、クロロホルムにて膨潤し
たセフデックス LH-20 カラムクロマトグラ
フィー (200 ml) にて精製し、5% MeOH 含有
 CHCl_3 溶出部より 1A (103mg, 収率 56.8%)
を得た。本品は、MeOH- CHCl_3 より再結晶し、
黄色結晶を得た。

化合物 1A

mp 279-280°C (分解)

MS (+SIMS) m/z : 454 ($M^+ + 1$)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$) δ :

3.75 (3H, s, N-CH₃)

3.92 及び 4.05 (各々 3H, s, $2 \times \text{OCH}_3$)

5.43 (2H, s, CH_2ph)

6.91 及び 7.36 (各々 1H, s, arom H)

7.54 及び 7.58 (4H, AA' BB',

J=8.6 Hz, arom H,

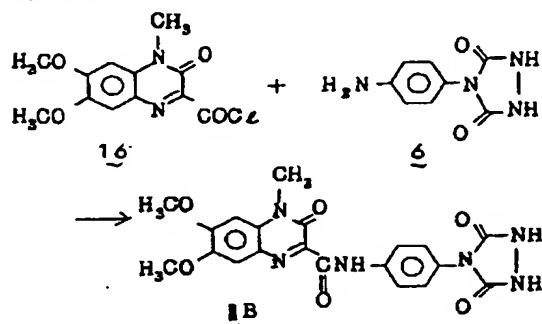
1.036 (2H, br. s, 2×NH)

元素分析: 計算値

(C₂₁H₁₉N₅O₇)CH₃OH: C, 54.43; H, 4.78; N, 14.43

測定値 : C, 54.42; H, 4.35; N, 14.83

(実施例 2)



酸クロリド 16 (20 mg, 0.07 mmol) の無水ベンゼン (2.5 ml) 懸濁液に、6 (9 mg, 0.047 mmol) の無水 DMF (0.1 ml) 溶液を一気に加え、反応混合液は、1 時間、加熱攪拌した。反応

ジニトロベラトロール 11 (0.91 g, 4 mmol) を EtOH (80 ml) に溶解し、PtO₂ (89 mg) 存在下室温にて常圧水素気流中接触還元を行なった。水素の消費 (理論消費量 540 ml) が完全に停止するまで約 17 時間反応を継続した。生じた淡黄緑色溶液は、窒素気流中セライトを通し触媒を除去し、母液は、2-ケトグルタル酸 (0.58 g, 4 mmol) を含む反応容器中に直接加え、直ちに加熱攪拌した。15 時間後、反応を終了し、反応液を冷却すると、粗黄色結晶が析出して来た。析出結晶を吸引濾取し、モノメチルサリノン体 17 (0.80 g, 収率 71.9%) を得、EtOH より再結晶し黄色針状晶 (0.62 g) を得た。

化合物 17

mp 250~252°

MS m/z (%): 278 (M⁺, 36), 260 (100),

232 (88), 217 (32), 189

(31), 161 (21)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 1715 及び 1644 (C=O)¹H-NMR (CDCl₃) δ:

(13)

液を室温に戻してから、析出している結晶を吸引濾取すると、黄色粗結晶生成物 1B (1.13 g, 収率 55.1%) が得られた。本品は、極めて難溶性のため、以下の反応には、精製することなく使用する。

化合物 1B

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:3.78 (3H, s, N-CH₃)3.89 及び 4.03 (各々 3H, s, 2×OCH₃)

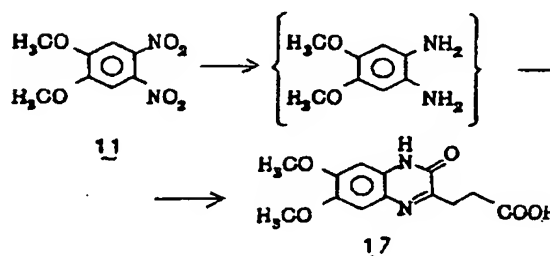
7.10 及び 7.47 (各々 1H, s, arom H)

7.45 及び 7.83 (4H, AA' BB',

J=9.0 Hz, arom H)

1.042 (2H, s, 2×NH)

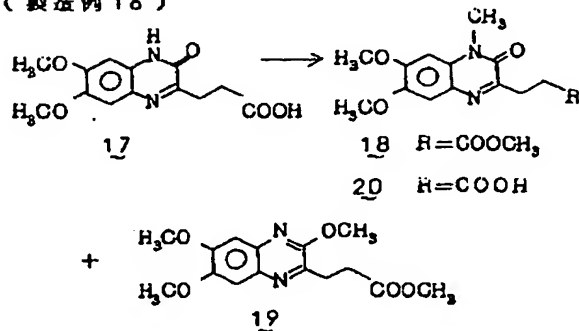
(製造例 15)

2.80 (2H, t, J=7.3 Hz, -CH₂CO-)3.15 (2H, t, J=7.3 Hz, -CH₂-)3.92 及び 3.93 (各々 3H, s, 2×OCH₃)

6.78 及び 7.18 (各々 1H, s, arom H)

1.192 (1H, br. sig., -COOH)

(製造例 16)



<方法 1>

氷冷した NaH (176 mg, 7.3 mmol) の無水 DMF (3 ml) 懸濁液に、攪拌下化合物 17 (606 mg, 2.2 mmol) の無水 DMF (20 ml) 溶液を約 20 分間かけて滴加し、更に 0.5 時間 0℃ にて攪拌を続けた。次に反応容器にヨウ化メチル

(455 μL, 7.3 mmol) を約10分間かけて滴加し、全反応液は、引き続き0℃にて15時間攪拌し、氷冷水(50 mL)中に注いだ。混合溶液は、CHCl₃(3×50 mL)にて抽出し、有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、蒸餾留去すると、粗生成物(570 mg)が得られた。本生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wacogel C-200, 24 g)にて精製し、n-Hexane:AcOEt(4:1~2:1; v/v)の溶出部よりN-メチル体18(492 mg, 収率73.8%)を得、MeOH-CHCl₃より再結晶し、淡黄色針状品を得た。O-メチル体19は、極少量得られたにすぎなかった(方法I参照)。

一方、CHCl₃抽出後の水層は、0.5 N HClにて酸性とした後、5% MeOH 含有CHCl₃にて再抽出し、有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、蒸餾留去するとカルボン酸20(86 mg, 13.5%)が結晶状に得られた。本品をMeOH-CHCl₃より再結晶すると黄色針状品が得られた。
<方法II>

KBr
IR $\nu_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$: 1740 及び 1651 (C=O)

¹H-NMR (CDCl₃) δ:

2.86 (2H, t, J=7.1 Hz, -CH₂CO)
3.25 (2H, t, J=7.1 Hz, -CH₂-)
3.69 及び 3.70 (各々 3H, s, N-CH₃, COOCH₃)
3.96 及び 4.01 (各々 3H, s, 2×OCH₃)
6.68 及び 7.25 (各々 1H, s, arom H)

化合物 19

mp 137~139℃

MS $m/z(\%)$: 306 (M^+ , 51), 275(10),
247(100), 203(10)

KBr
IR $\nu_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$: 1729 (C=O)

¹H-NMR (CDCl₃) δ:

2.89 (2H, m)
3.24 (2H, m)
3.71 (3H, s, COOCH₃)
4.00 及び 4.02 及び 4.07 (各々 3H, s, 3×OCH₃)
7.17 及び 7.27 (each 1H, s, arom H)

(14)

カルボン酸 17 (100 g, 3.60 mmol) を CH₂Cl₂-MeOH (1:1; v/v, 100 mL) に溶解し、室温攪拌下ジアゾメタンのエーテル溶液を原料の17が消失するまで所加した。過剰のジアゾメタンは、窒素気流にて留去した後、減圧下溶媒を留去すると、結晶性残量(114 g)が得られた。本生成物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Wacogel C-200, 50 g)にて精製し、n-Hexane:AcOEt(6:1; v/v)溶出部よりO-メチル体19(480 mg, 収率43.6%)及びn-Hexane:AcOEt(1:1; v/v)溶出部よりN-メチル体18(528 mg, 収率48.0%)をそれぞれ得た。O-メチル体19は、MeOH-CHCl₃より再結晶し、無色プリズム品を得た。

化合物 18

mp 174~175℃

MS $m/z(\%)$: 306 (M^+ , 100), 274(35),
258(14), 247(88), 231
(24), 203(20)

化合物 20

mp 239~241℃

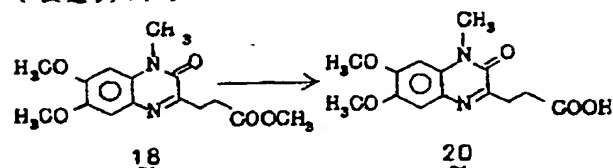
MS $m/z(\%)$: 292 (M^+ , 53), 274(99),
246(100), 231(53), 203
(41), 175(27)

KBr
IR $\nu_{\max}^{\text{cm}^{-1}}$: 1734 及び 1628 (C=O)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

2.70 (2H, t, J=6.9 Hz, CH₂CO)
3.00 (2H, t, J=6.9 Hz, CH₂CH₂CO)
3.65 (3H, s, N-CH₃)
3.84 及び 3.94 (各々 3H, s, 2×OCH₃)
6.98 及び 7.22 (各々 1H, s, arom H)

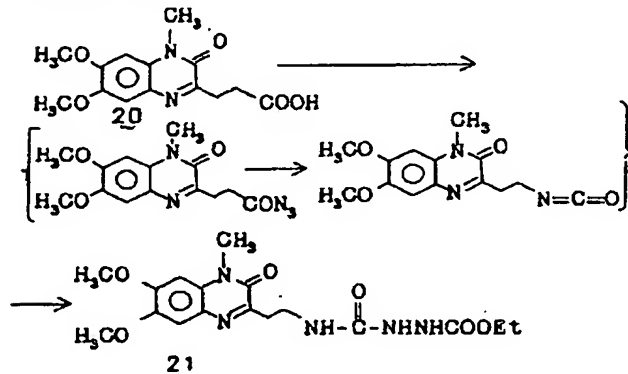
(製造例 17)



N-メチル体18(115 g, 3.75 mmol) を 1,4-ジオキサン(18 mL) 及び 1 N NaOH 水溶液(10 mL)に溶解し、室温下10分間攪拌反応

させた。反応混合液は、希塩酸性とした後、10% MeOH 含有 CHCl_3 にて水層の螢光が消失するまで抽出を繰り返した。合一した有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去し、粗結晶カルボン酸 20 (105g, 収率95.9%) を得た。本品は、MeOH- CHCl_3 より再結晶し、純品 20 (852mg) 得、このものは、先に得ている化合物 20 と一致した。

(製造例18)

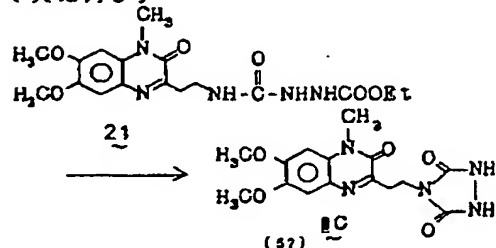


カルボン酸 20 (500mg, 1.71 mmol) を無水 DMF (12 ml) に溶解し、本攪拌溶液に

330(1), 289(92), 246(47),
234(100), 219(22), 205(24)
KBr
IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 1731, 1669 及び 1649 (C=O)
 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ :

1.18 (3H, t, $J=6.9\text{Hz}$, CH_2CH_3)
2.95 (2H, t, $J=5.9\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$)
3.52 (2H, m, CH_2NH)
3.67 (3H, s, N- CH_3)
3.89 及び 3.97 (各々 3H, s, $2 \times \text{OCH}_3$)
4.02 (2H, q, $J=6.9\text{Hz}$, CH_2CH_3)
6.40 (1H, br, sig, NH)
6.91 及び 7.31 (各々 1H, s, arom H)
7.70 (1H, br, s, NH)
8.65 (1H, br, sig, NH)

(実施例3)



(15) リエチルアミン (0.36 ml, 2.57 mmol), ジフェニルリン酸アジド (0.55 ml, 2.57 mmol) を順次添加した。反応1時間後にジフェニルリン酸アジド (0.34 mmol) を追加し、更に15時間室温下攪拌を行ない、淡黄緑色溶液を得た。減圧下速やかに溶媒留去し、残液を高真空下乾燥した。乾燥生成物に無水ベンゼン (20 ml) を加え、混合溶液を1時間加熱還流した。一度反応液を室温に戻した後、カルバジン酸エチル (178mg, 1.71 mmol) を加えた。反応液は、再び0.5時間還流後、更に室温下0.5時間攪拌し、溶媒を留去した。得られた淡黄色残液 (1976g) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (90g) にて精製し、4~5% MeOH 含有 CHCl_3 溶出部よりセミカルバジド 21 (230mg) を得た。未分離分画は、再シリカゲルカラムクロマトグラフィー (15g) に対し、更に 21 (164mg) を得、合計収率は58.6%であった。

化合物 21

MS m/z (%): 393 (M^+ , 5), 347 (0.8),

セミカルバジド 21 (272mg, 0.69 mmol), 粉砕した無水炭酸カリウム (191mg, 1.38 mmol) 及び abs EtOH (20 ml) の懸濁液を6時間、加熱還流した。減圧下溶媒留去し、残液に水 (30 ml) を加え、2N HCl にて酸性とした。水層は、10% MeOH 含有 CHCl_3 (3 \times 50 ml) にて抽出し、有機層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去すると、淡黄色結晶 (222mg) が得られ、MeOH- CHCl_3 より再結晶し、黄色プリズム晶として、1C (130mg) を得た。結晶母液 (70mg) は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (10g) にて精製し、5% MeOH 含有 CHCl_3 溶出部より更に 1C (64mg) を得、合計収率は80.8%であった。

化合物 1C

mp 250~253 $^{\circ}\text{C}$

MS m/z (%): 347 (M^+ , 5), 289 (2),

246(100), 231(35), 203

(20), 175(20), 101(12)

KBr
IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 1694 及び 1640 (C=O)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

3.02 (2H, t, J=6.9Hz,

3.65 (3H, s, N-CH₃)

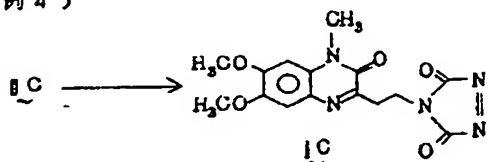
3.80 (2H, t, J=6.9Hz,

3.84及び3.95 (各々3H, s, 2×OCH₃)

6.96及び7.26 (各々1H, s, arom H)

9.95 (2H, s, 2×NH)

(実施例4)



トリアゾリジン 1C (10.0 mg, 0.029 mmol) の無水DMF (1 ml) 溶液に PhI(OAc)₂ (112 mg, 0.035 mmol) を加え、室温にて1時間攪拌した。減圧下DMFを留去すると赤色固体状残渣が得られた。本品をCH₂Cl₂-benzeneより結晶化すると、極微量であるが、目的の1Cの赤色プリズム晶が得られて来た。現在、大量に純品の1Cを得るための方法(昇華法等)を検討中であ

は、20% MeOH 含有水にて溶出し、トリアゾリジン 1D (9.5 mg, 収率70.9%) を黄赤色粘着性物質として得た。

化合物 1D

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1688 (C=O)1586及び1301 (NO₂)MS m/z(%): no M⁺¹H-NMR (DMSO-d₆) δ:

1.99 (2H, m)

3.4~3.5 (4H, m)

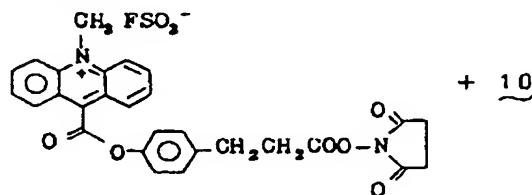
6.42 (1H, d, J=9.2Hz, arom H)

8.51 (1H, d, J=9.2Hz, arom H)

9.42 (1H, m, NH)

10.10 (2H, s, 2×NH)

(実施例6)

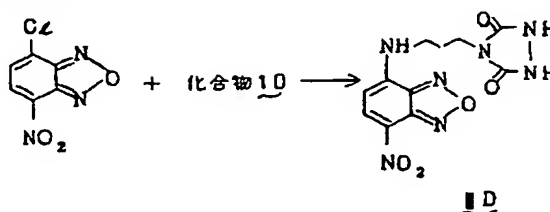


(16)る。

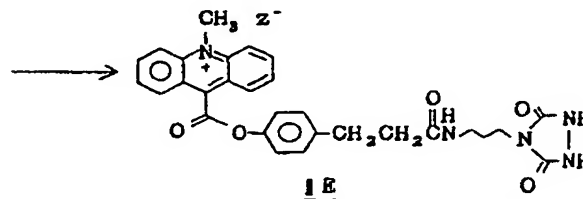
化合物 1C

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 1785, 1770及び1640 (C=O)

(実施例5)



アミノ体 1D (9.8 mg, 0.05 mmol) 及び炭酸カリウム (15.2 mg, 0.11 mmol) の水溶液 (0.25 ml) に 7-クロロ-4-ニトロベンゾフラザン (8.3 mg, 0.041 mmol) の EtOH (1 ml) 溶液を約5分間かけて滴加した。生じた暗紫色溶液は、室温で10分攪拌した後、60-70℃にて5分間加熱攪拌した。暗紫色反応懸濁液は、2N HClにて酸性にすると暗赤色溶液となった。減圧下溶媒留去し、得られた残渣 (44.5 mg) は、ODS カラムクロマトグラフィー (Waters 社、分取用 ODS 充填剤 5 g) にて精製した。カラム



N-メチルアクリジニウム

4-(2-サクシニミジルオキシカルボニルエチル)
フェニル-10-メチルアクリジニウム-9-カルボキシレート フルオロスルホネート

N-メチルアクリジニウム (22 mg, 0.038 mmol) の無水DMF (0.5 ml) 溶液にアミノ体 1D (7.6 mg, 0.048 mmol) を加え、生じた反応懸濁液を外浴50-60℃にて6時間加熱攪拌した。減圧下DMFを留去し、暗黄色残渣 (43.5 mg) に塩酸水溶液 (0.057 mmolの塩化水素に相当する量) 及び MeOH を加え残渣を溶解した。再び溶媒を留去し、残渣をセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィー (55 ml) にて精製した。EtOH にてカラムを充填し、EtOH にて溶出せしめた。溶出容量 37~46

mlの黄色分画を集め化合物 II E (2.24 mg, 収率 94.8%)を得た。

化合物 II E

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ :

- 1.67 (2H, m, $-\text{HNCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)
 2.46 (2H, t, $J=7.3\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$)
 2.94 (2H, t, $J=7.6\text{Hz}$, PhCH_2-)
 3.06 (2H, m, $-\text{HNCH}_2-$)
 3.36 (2H, t, $J=6.6\text{Hz}$, $-\text{CH}_2\text{N}$)
 4.97 (3H, s, $+N-\text{CH}_3$)
 7.46及び7.65 (4H, AA' BB', $J=8.6\text{Hz}$, arom H)
 7.92 (1H, m, NH)
 8.19 (2H, m, arom H)
 8.57 (2H, m, arom H)
 8.62 (2H, d, $J=8.6\text{Hz}$, arom H)
 8.96 (2H, d, $J=9.2\text{Hz}$, arom H)
 10.10 (2H, br. s, $2\times\text{NH}$)

以下に本発明化合物とビタミンD類との反応例

Diels-Alder Adducts (ディールス-アルダー付加体) II a, b, c, d, e の合成

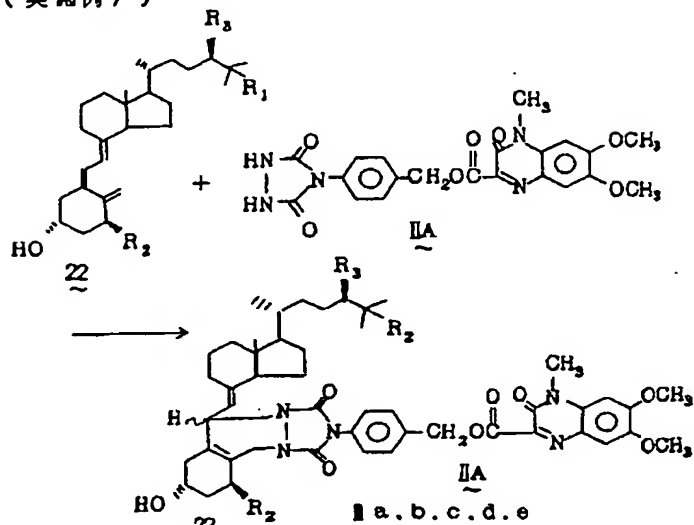
<方法1> $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ による II A の酸化、引き続く D.A. 反応

Vitamin D₃ 22a (9.1 mg, 0.024 mmol), II A (1.29 mg, 0.028 mmol), 無水DMF (0.2 ml), 無水THF (0.3 ml) 及び gl. AcOH (5 μL) の懸濁液を -75°C に冷却し、本攪拌液に $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ (1.89 mg, 0.043 mmol) を加えた。反応懸濁液は、 $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ 添加5分後より赤色を帯びて来た。反応液は1時間 -75°C にて攪拌した後、室温に戻し更に1時間反応を行なった。反応混合物を氷冷水に注ぎ、 CHCl_3 (3 \times 15 ml) にて抽出した。 CHCl_3 層は、飽和食塩水にて洗浄、芒硝乾燥、溶媒留去した。得られた黄色粘着性物質 (2.20 mg) は、Preparative TLC (Merck 社製, silica gel 60 F₂₅₄, 20 cm (W) \times 10 cm (H) \times 0.5 mm (T) \times 4枚, 展開溶媒 2% MeOH 含有 CHCl_3) にて精製し、主成分体 II a ($\text{C}_6-\alpha\text{H}$; 9.0 mg) 及びその異性体

II b について説明する。

紫外光吸収試験とビタミンD誘導体との反応

(実施例7)



- a = $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$
 b = $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{H}$ $\text{R}_2=\text{OH}$
 c = $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_2, \text{R}_3=\text{H}$
 d = $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{H}$
 e = $\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}$ $\text{R}_2=\text{H}$

II a' ($\text{C}_6-\beta\text{H}$; 1.6 mg) を得た。合計収率は、53.5%であった。II a ($\text{C}_6-\alpha\text{H}$) は、黄色結晶として得られ、 $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ より再結晶し、黄色針状晶を得た。

化合物 II a ($\text{C}_6-\alpha\text{H}$)

mp $143\sim 145^\circ\text{C}$

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm(log ϵ): 217(4.72).

24(Shoulder). 322(3.80).

401(4.07).

元素分析: 計算値

($\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$): C. 67.50; H. 7.43; N. 8.20.

測定値: C. 67.08; H. 7.18; N. 8.12.

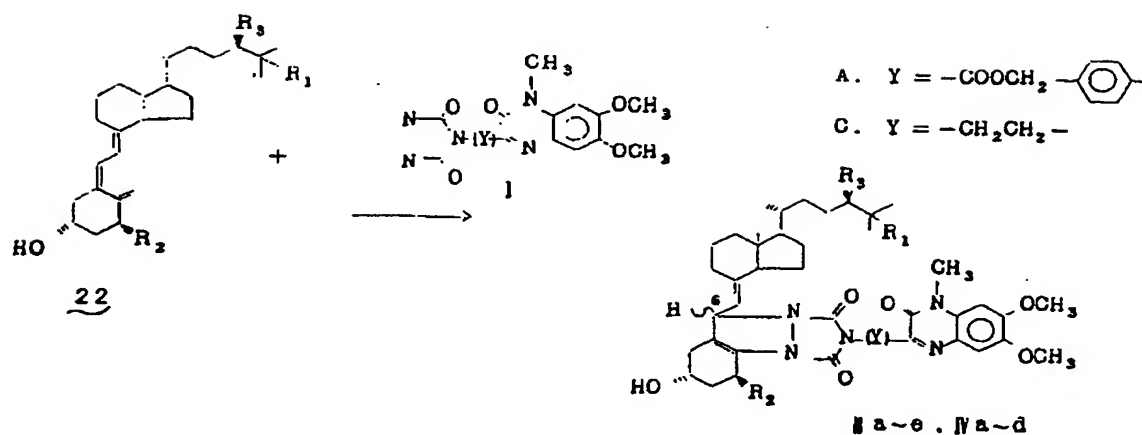
<方法2> $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ による II A の酸化、引き続くビタミンDとの反応

II A (10.0 mg, 0.022 mmol) の無水DMF (1 ml) 溶液に、 $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (7.5 mg, 0.023 mmol) を加え、室温攪拌下、反応液が十分な赤色を呈するまで約0.5~1時間攪拌を継続した。本赤色溶液に、2.4.25(OH)₂D₃ 22e (5.0 mg, 0.012 mmol) を加え、溶液の赤色が消失する

まで更に15時間攪拌した。減圧下ろ液を留去し、
 黄褐色粘着性物質(24.1g)を得。preparative
 TLC (Merck社製 Silica gel 60 F₂₅₄ .
 20cm (W) × 10cm (H) × 0.5cm (T) × 4枚、展
 開溶媒5% MeOH含有CH₂Cl₂)にて精製し、
 付加体 IIe (C₉-αH & βHの混合物、10.4g、
 収率定量的)を非結晶性黄色粘着性物質として得
 た。

このようにして得たビタミンD類と本発明試薬
 との付加体の異性体生成比及び収率を第1表に示
 す。

第 1 表



Entry	ジエン類 (ビタミンD ₃ 類)	ジエノフィル ^{a)}	付加体 ^{b)} (異性体生成比)	収率 ^{c)} (%)
1	ビタミンD ₃ (R ₁ =R ₂ =R ₃ =H)	<u>IA</u>	<u>IIa</u> (R ₁ =R ₂ =R ₃ =H) (6 : 1)	54
2	1α(OH)D ₃ (R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =OH)	<u>IA</u>	<u>IIb</u> (R ₁ =R ₃ =H, R ₂ =OH) (1 : 1)	77
3	25(OH)D ₃ (R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =H)	<u>IA</u>	<u>IIc</u> (R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =H) (4.4 : 1)	86

4.	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$)	<u>I A</u>	<u>Id</u> ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$) (1 : 1)	63
5.	$24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ($\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$)	<u>I A</u>	<u>Ie</u> ($\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$) (5 : 1)	100
6.	ビタミン D_3	<u>I C</u>	<u>Iva</u> ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$) (28 : 1)	78
7.	$25(\text{OH})\text{D}_3$	<u>I C</u>	<u>Ivb</u> ($\text{R}_1=\text{OH}, \text{R}_2=\text{R}_3=\text{H}$) (28 : 1)	67
8.	$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	<u>I C</u>	<u>Ivc</u> ($\text{R}_1=\text{R}_2=\text{OH}, \text{R}_3=\text{H}$) (24 : 1)	86
9.	$24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$	<u>I C</u>	<u>Ivd</u> ($\text{R}_1=\text{R}_3=\text{OH}, \text{R}_2=\text{H}$) (3.7 : 1)	47

細 a) I A 及び C の酸化型トリプツリン I A 及び C は、 $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ を用いて反応系内にて合成した。

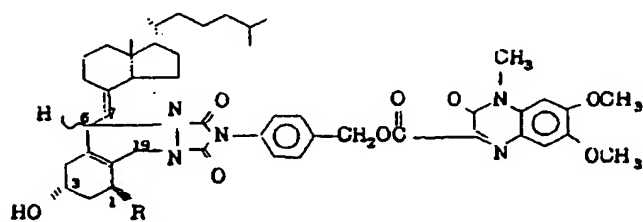
(ただし、Entry 1 は、 $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ を用いた時の結果を示してある)

b) C-6 位における α 及び β -H 型の異性体の生成比は、HPLC を用い、各ピークの面積比より求めた結果を示してある。

c) 収率は二つの異性体の合計収率を示してある。また単離収率を示した。

I a 及び I b の化合物については、 C_6 - α H 及び β H 体をそれぞれ分離し、 ^1H -NMR を測定した。結果を第 2 表に示す。

第 2 表



I a : $\text{R} = \text{H}$

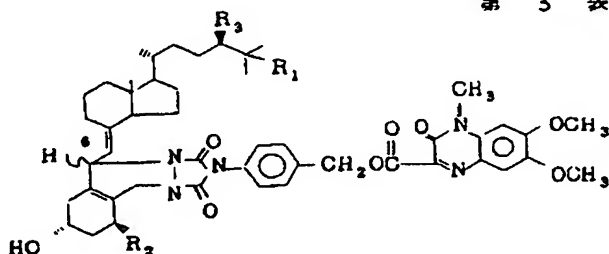
I b : $\text{R} = \text{OH}$

	I a ($\text{R} = \text{H}$)		I b ($\text{R} = \text{OH}$)	
	主生成物 極性小	副生成物 極性大	主生成物 極性小	副生成物 極性大
18- CH_3	0.50 (s)	0.54 (s)	0.53 (s)	0.50 (s)
26- CH_3	0.85 (d, $J=6.6$)	0.86 (d, $J=6.6$)	0.86 (d, $J=6.6$)	0.85 (d, $J=6.6$)
27- CH_3	0.86 (d, $J=6.6$)	0.87 (d, $J=6.6$)	0.87 (d, $J=6.6$)	0.86 (d, $J=6.6$)
21- CH_3	0.89 (d, $J=5.9$)	0.91 (d, $J=6.3$)	0.91 (d, $J=5.9$)	0.89 (d, $J=5.9$)
4-H	—	—	2.51 (m)	2.26 (m)
19-H	3.88 (AB, $J=17.0$)	3.85 (AB, $J=15.5$)	3.86 (AB, $J=16.1$)	0

19-H	4.17 (AB, J=17.0)	4.16 (AB, J=15.5)	4.69 (AB, J=16.1)	0 } 4.26 (m)
3-H	4.12 (m)	4.10 (m)	4.20 (m)	0 }
1-H	-	-	4.36 (m)	4.43 (m)
6-H	4.77 (AB, J=9.9)	4.76 (AB, J=9.9)	4.80 (AB, J=9.9)	4.75 (AB, J=9.9)
7-H	4.96 (AB, J=9.9)	5.00 (AB, J=9.9)	5.05 (AB, J=9.9)	5.01 (AB, J=9.9)
N-CH ₃	3.74 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)	3.74 (s)
2xOCH ₃	3.95(s) 4.05(s)	3.94(s) 4.05(s)	3.95(s) 4.05(s)	3.95(s) 4.05(s)
CH ₂ ph	5.47 (s)	5.45 (s)	5.47 (s)	5.48 (s)
Arom-H	6.68(s) 7.38(s)	6.68(s) 7.34(s)	6.68(s) 7.38(s)	6.68(s) 7.39(s)
Arom-H	7.59 & 7.50 (AA' BB', J=8.6)	7.58 & 7.54 (AA' BB', J=8.6)	7.54 & 7.59 (AA' BB', J=8.6)	7.50 & 7.59 (AA' BB', J=8.6)

■ c, ■ d 及び ■ e の化合物については立体異性体を分離することなく ¹H-NMR を測定した。結果を第 3 表に示す。

第 3 表

■ c: R₁=OH, R₂=R₃=H■ d: R₁=R₂=OH, R₃=H■ e: R₁=R₃=OH, R₂=H

	■ c (R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =H)		■ d (R ₁ =R ₂ =OH, R ₃ =H) C ₆ -αH ₂ /H 1:1 混合物		■ e (R ₁ =R ₃ =OH, R ₂ =H)	
	主生成物	副生物			主生成物	副生物
18-CH ₃	0.50 (s)	0.54 (s)	0.51 (s)	0.52 (s)	0.51 (s)	0.54 (s)
26及び27-CH ₃	1.20 (s)	"	1.20 (s)	1.21 (s)	1.15(s) 1.20(s)	"
21-CH ₃	0.91 (d, J=5.9)	"	0.91 (d, J=5.9)	0.92 (d, J=6.3)	0.91 (d, J=5.9)	"
4-H	-	"	2.26 (m)	2.50 (m)	-	"
19-H	3.88 (AB, J=15.5)	"	3.86 (AB, J=17.8)	0 }	3.88 (AB, J=15.8)	"

(21)

19-H	4.17 (AB, J=15.5)	"	4.70 (AB, J=17.8)	o } 4.26 (m)	4.17 (AB, J=15.8)	"
3-H	4.12 (m)	"	4.20 (m)	o }	4.12 (m)	"
1-H	-	"	4.34 (m)	4.43 (m)	-	"
6-H	4.77 (AB, J=9.9)	"	4.80 (AB, J=9.6)	4.75 (AB, J=9.9)	4.77 (AB, J=9.8)	"
7-H	4.97 (AB, J=9.9)	"	5.04 (AB, J=9.6)	5.00 (AB, J=9.9)	4.96 (AB, J=9.8)	"
24-H	-	"	-	-	3.32 (m)	"
N-CH ₃	3.74 (s)	"	3.740 (s)	3.742 (s)	3.74 (s)	"
2xOCH ₃	3.95(s) 4.05(s)	"	3.95(s) 4.05(s)	"	3.95(s) 4.05(s)	"
CH ₂ ph	5.48 (s)	5.47 (s)	5.47 (s)	5.48 (s)	5.47 (s)	"
Arom-H	6.68(s) 7.383(s)	" 7.376(s)	6.69(s) 7.384(s)	" 7.378(s)	6.68(s) 7.38(s)	" 7.37(s)
Arom-H	7.50及び7.58 (AA' BB', J=8.9)	"	7.50及び7.54 (AA' BB', J=8.9)	7.56及び7.59 (AA' BB', J=8.9)	7.50及び7.58 (AA' BB', J=8.6)	"

ビタミン D₃ 誘導体と本発明医薬(化合物)A)との付加物である化合物 c、d 及び e の混合液について、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)による分離を次の条件により行なった。

HPLC分離条件

カラム: Li Chrospher 100 RP-18 (e) (5 μ m)

4 mm \times 250 mm

溶離剤: 水: メタノール = 27:73 (v/v)

流速: 1 ml/分

検出: Ex 395 nm, Em 500 nm

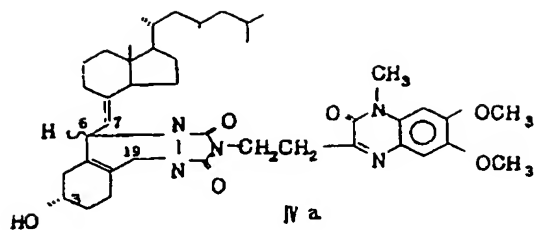
サンプルサイズ: [c(~6 ng) + d(~6 ng) + e(~6 ng)] / 10 μ l エタノール


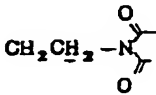
結果を第1図に示す。図中、c、d、e は主生成物を、c'、d'、e' は副生成物をそれぞれ表わす。

化合物 A の2つ異性体 (C₈- α H 及び β H) は preparative TLC によりそれぞれ分離してから、¹H-NMR を測定した。結果を第4表に示す。

(22)

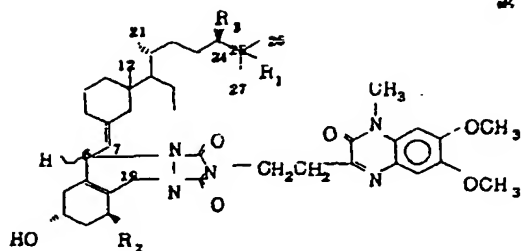
第 4 表



	IV a	
	主生成物 (極性小)	副生成物 (極性大)
18-CH ₃	0.52 (3H, s)	0.51 (3H, s)
26及び27-CH ₃	0.85 (3H, d, J=6.6)	0.86 (3H, d, J=6.6)
	0.86 (3H, d, J=6.6)	0.87 (3H, d, J=6.6)
21-CH ₃	0.90 (3H, d, J=5.9)	0.91 (3H, d, J=5.9)
	3.20 (2H, m)	3.23 (2H, t, J=6.7)
N-CH ₃	3.70 (3H, s)	3.69 (3H, s)
2×OCH ₃	3.94 (3H, s)	3.94 (3H, s)
	4.01 (3H, s)	4.01 (3H, s)
3-H	N-CH ₃ 及び 2×OCH ₃ とオーバーラップ	
19-H ₂		
		
6-H	4.69 (1H, AB, J=10.1)	4.66 (1H, AB, J=10.1)
7-H	4.87 (1H, AB, J=10.1)	4.88 (1H, AB, J=10.1)
Arom-H	6.68 (1H, s)	6.67 (1H, s)
	7.23 (1H, s)	7.22 (1H, s)

IV b, IV c 及び IV d の化合物については、異性体を分離することなく⁽²³⁾ ¹H-NMR を測定した。結果を第 5 表に示す。

表 5

IV b: $R_1=OH, R_2=R_3=H$ IV c: $R_1=R_2=OH, R_3=H$ IV d: $R_1=R_3=OH, R_2=H$

	IV b ($R_1=OH, R_2=R_3=H$)		IV c ($R_1=R_2=OH, R_3=H$)		IV d ($R_1=R_3=OH, R_2=H$)	
	主生成物	副生成物	主生成物	副生成物	主生成物	副生成物
18-CH ₃	0.52 (s)	0.51 (s)	0.50 (s)	0.51 (s)	0.54 (s)	0.52 (s)
²⁶ ₂₇ -CH ₃	1.20 (s)	1.21 (s)	1.21 (s)	1.20 (s)	1.16 (s) 1.21 (s)	" "
21-CH ₃	0.91 (d, J=6.3)	"	0.92 (d, J=5.9)	"	0.92 (d, J=5.9)	"
	3.21 (m)	"	3.22 (t, J=6.6)	"	3.1~3.3 (m)	"

N-CH ₃	3.69 (s)	"	3.69 (s)	"	3.70 (s)	"
2×OCH ₃	3.94 (s) 4.01 (s)	" "	3.94 (s) 4.01 (s)	" "	3.94 (s) 4.01 (s)	" "
1-H			4.30 (m)	4.35 (m)		
19-H	0		4.51 (AB, J=15.8)	"	0	
19-H	0	N-CH ₃ 及び 2×OCH ₃ と オーバーラップ	N-CH ₃ 及び 2×OCH ₃ とオーバーラップ		0	N-CH ₃ 及び 2×OCH ₃ と オーバーラップ
3-H	0				0	
	0				0	
6-H	4.69 (AB, J=9.6)	"	4.70 (AB, J=9.9)	"	4.69 (AB, J=9.6)	"
7-H	4.88 (AB, J=9.6)	"	4.93 (AB, J=9.9)	"	4.88 (AB, J=9.6)	"
Arom-H	6.68 (s) 7.23 (s)	" "	6.68 (s) 7.23 (s)	" "	6.68 (s) 7.23 (s)	" "

ビタミンD₃誘導体と本発明試薬(化合物I C)との付加物である化合物IV b、IV c及びIV dの混合液について、HPLCによる分離を次の条件で行なった。

HPLC分離条件

カラム: Li Chrospher 100RP-18(®) (5µm)

4mm × 250mm

溶剤: (直線的勾配溶剤による)

0分 水: メタノール = 40:60

30分後 水: メタノール = 20:80

40分後 水: メタノール = 20:80

流速: 1ml/分

検出: Ex. 370nm, Em. 440nm.

サンプルサイズ: [IV b (~15ng) + IV c (~12ng) + IV d (~15ng)] / 10µl エタノール

結果を第2図に示す。図中、IV b、IV c、IV d は主生成物を、IV b'、IV c'、IV d' は副生成物をそれぞれ表す。

以下に本発明化合物とビタミンA類との反応例について説明する。

TLCで10% MeOH/CH₂Cl₂を用いて精製する。Vaの収量11mg (44%)。

Va: UV (95% EtOH) 400, 307,

247, 218nm. IR (KBr) 1770,

1719, 1655 cm⁻¹

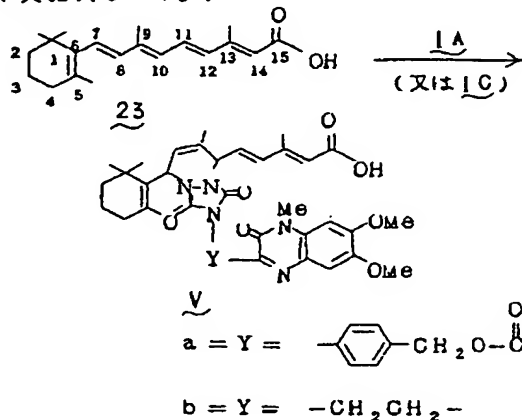
¹H NMR (CDCl₃) δ 1.05及び1.14 (各々3H, s, Me-1), 1.75 (3H, s, Me-5), 1.81 (3H, s, Me-9), 2.21 (3H, s, Me-13), 3.73 (3H, s, NMe), 3.94及び4.04 (各々3H, s, OMe), 4.83 (1H, s, H-7), 4.85 (1H, d, J=8.6, H-10), 5.47 (1H, s, H-8), 5.83 (1H, s, H-14), 5.45 (2H, s, O-CH₂), 6.02 (1H, dd, J=15及び8.6, H-11), 6.47 (1H, d, J=15, H-12), 6.67及び7.37 (each 1H, s, キノキサリン), 7.55及び7.58 (each 2H, AA' BB', J=9, Ar)

(実施例9) ビタミンA酸 (Retinoic acid)

(23)とICとの反応

(24) 蛍光試薬ICとビタミンA誘導体との反応

(実施例8~10)



(実施例8) ビタミンA酸 (Retinoic acid)

(23)と蛍光試薬1Aとの反応

1A (22mg, 50µmol) のDMF溶液 (2ml) に PhI(OAc)₂ (16mg, 50µmol) を加え室温で30分攪拌し、1Aを調製する。この溶液を retinoic acid (10mg, 33µmol) の CH₂Cl₂ (20ml) 溶液に0℃ Ar 気流下滴下する。0℃30分後溶液を留去し、シリカゲルの

IC (7mg, 20µmol) のDMF (500µl) の溶液に PhI(OAc)₂ (7.8mg, 24µmol) を加え室温で30分攪拌し、ICの炭赤色溶液を調製する。Retinoic acid (3.5mg, 12µmol) の CH₂Cl₂ (10ml) 溶液に上記ICの溶液を0℃にて加え Ar 気流下30分間攪拌する。溶液を留去し残液をシリカゲルのTLCで10% MeOH/CH₂Cl₂にて精製し、付加体Vb (5mg, 66%)を得る。

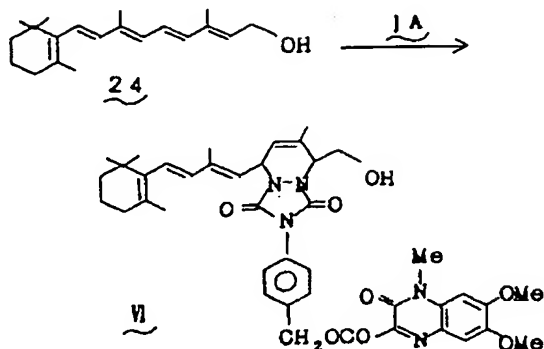
Vb UV (95% EtOH) 368, 244, 213nm

IR (KBr) 1771, 1715, 1649 cm⁻¹

MS m/e 646 (M⁺-1), 601, 399, 355

¹H NMR (CDCl₃) δ 0.88及び0.95 (各々3H, s, Me-1), 1.59 (3H, s, Me-5), 1.77 (3H, s, Me-9), 2.19 (3H, s, Me-13), 3.67 (3H, s, NMe), 3.93及び4.01 (各々3H, s, OMe), 4.61 (1H, s, H-7), 4.74 (1H, d, J=8.6, H-10), 5.37 (1H, s, H-8), 5.86 (1H, s, H-14), 5.96 (1H,

dd, $J=15$ 及び 8.6 , $H-11$), $\delta 3.5$ (1H, d, $J=15$, $H-12$), $\delta 3.2$ 及び 4.0 (各々 2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)



(実施例10) ビタミンA (Retinol) (24) と

IAの反応

IA (15mg, $3.5 \mu\text{mol}$) より調製した IA の DMF 溶液を retinol (24) (10mg, $3.5 \mu\text{mol}$) の CH_2Cl_2 (20ml) 溶液に -78°C で加え、30分攪拌する。溶媒除去後残渣をシリカゲルのカラムで $\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 50:

(25) 50:1を溶媒に用いて精製し、付加体 VI (14mg, 55%) を得る。

化合物 VI:

IR (KBr) $3440, 1771, 1711, 1655 \text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 0.992 及び 0.987 (各々 3H, s, Me-1), 1.66 (3H, s, Me-5), 1.99 (3H, s, Me-9), 1.91 (3H, s, Me-13), 3.74 (3H, s, NMe), 3.95 及び 4.05 (各々 3H, s, OMe), 3.56 (1H, dd, $J=8$ 及び 4 , OH, D_2O 添加消失), 4.24 及び 3.87 (各々 1H, m, $H-15$), 4.44 (1H, d, $J=6$, $H-14$), 5.22 (1H, d, $J=9$, $H-10$), 5.31 (1H, m, $H-11$), 5.70 (1H, m, $H-12$), 5.99 (1H, d, $J=16.5$, $H-8$), 6.17 (1H, d, $J=16.5$, $H-7$)

MS m/e 491 ($\text{M}^+ - \text{CO}$), 302, 220

発明の効果

以上説明したように本発明により合成した蛍光もしくは化学発光試薬は cis-ジエンを持つ化合物と速く特異的かつ定量的に反応する。従ってこれらの試薬は cis-ジエンを持つ化合物、特にビタミンD、Aおよびそれらの代謝物の検出・定量分析に適している優れた試薬であるといえる。

4. [図面の簡単な説明]

第1図は、ビタミンD₃各誘導体と本発明試薬IAとの付加体をHPLCによって分離した後に検出した各々の付加体のピークを表わすクロマトグラムである。

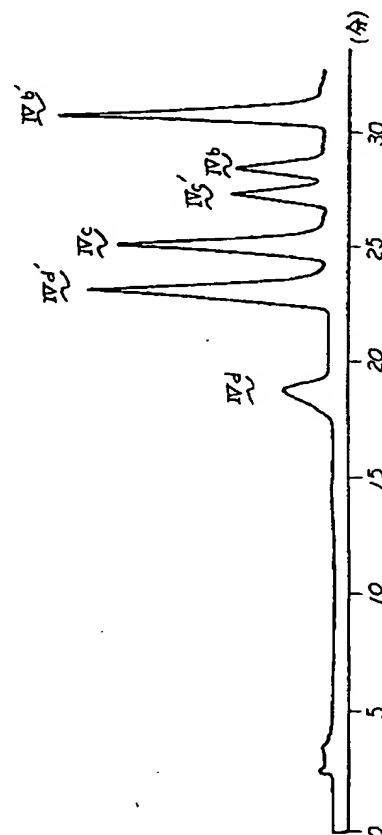
第2図は、ビタミンD₃各誘導体と本発明試薬ICとの付加体をHPLCによって分離した後に検出した各々の付加体のピークを表わすクロマトグラムである。

特許出願人 株式会社バイオセンサー研究所

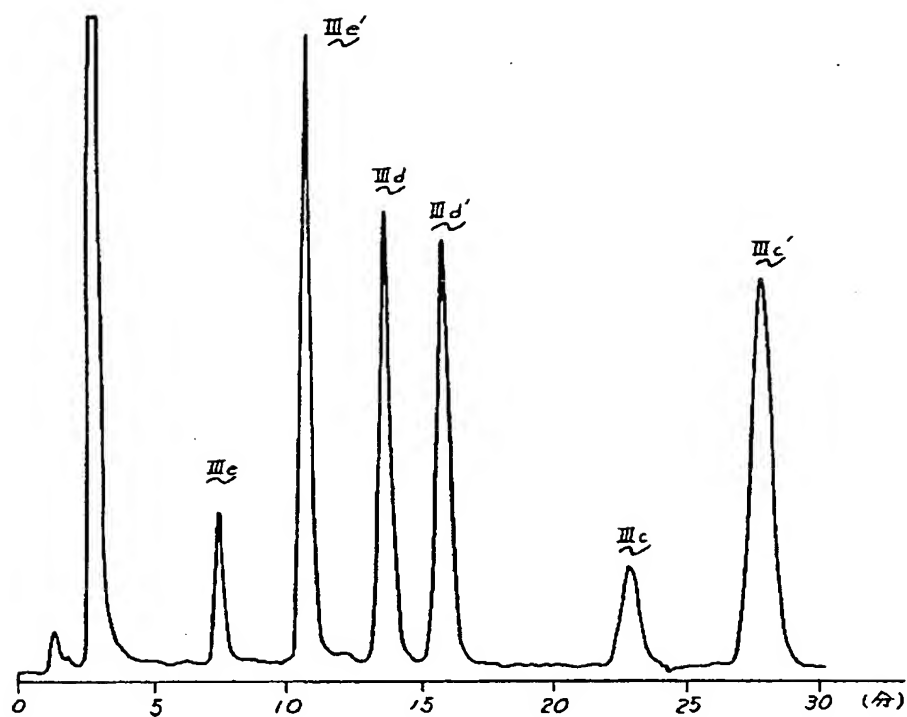
代理人 井理士 湯浅 恭三

(外4名)

第2図



第 1 図



第 1 頁の続き

⑨Int. Cl. 5

C 07 D 403/12
 405/06
 405/12
 413/06
 413/12
 471/04
 491/056
 G 01 N 31/22

識別記号

1 1 2 T

1 2 2

庁内整理番号

8213-4 C
 8213-4 C
 8213-4 C
 8213-4 C
 8213-4 C
 8829-4 C
 7019-4 C
 9015-2 G